

氏 名	藤 井 駿 吾
学位(専攻分野の名称)	博 士 (食品栄養学)
学 位 記 番 号	甲 第 730 号
学 位 授 与 の 日 付	平成 28 年 9 月 30 日
学 位 論 文 題 目	イソフラボン代謝産物の骨代謝改善効果とその作用メカニズム解析
論 文 審 査 委 員	主査 教 授・農学博士 上 原 万里子 教 授・農学博士 大 石 祐 一 准 教 授・博士(医学) 高 橋 信 之 博士(歯学) 石 見 佳 子*

論文内容の要旨

近年わが国では超高齢社会を迎え、それに伴う骨粗鬆症患者が急増している。骨粗鬆症は死に直結する疾病ではないが、骨折から寝たきりに至り、患者の QOL の著しい低下につながる。特に女性では、閉経によるエストロゲン欠乏に起因する骨粗鬆症に罹患する割合が高く、その予防や改善は重要である。閉経後骨粗鬆症の治療には、エストロゲン投与によるホルモン補充療法があるが、乳がんや子宮がんなどのリスクが増大する可能性が指摘されている。一方、大豆イソフラボンはエストロゲンと類似の構造をとり、エストロゲン受容体との親和性を有することから植物エストロゲンと呼ばれているが、エストロゲンとは異なり、生殖器官への副作用を最小限に留め、骨・脂質系に対し、選択的に効果を発揮する Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) であることが示唆されている。また、SERM としての主な生理作用は、イソフラボン代謝産物の Equol が担っていると考えられている。Equol は主要イソフラボンである Daidzein の代謝産物であり、腸内細菌により配糖体 Daidzin の糖鎖が切断され、アグリコンの Daidzein となることで吸収される。吸収後、肝臓で主にグルクロン酸抱合を受けて排泄されるが、一部は腸肝循環し、その間に Equol または *O*-desmethylangolensin (*O*-DMA) に変換される。しかし、ヒトにおけるこれら代謝産物、特に Equol 産生能については個人差が大きく、Equol 非産生者が、生理作用の強い Equol による骨代謝改善効果を楽しむには Equol 産生の向上が期待できる食品因子を同時に摂取するか、Equol 自体をサプリメントとして摂取する必要がある。Equol 産生に影響を及ぼす因子として、近年、実験動物での Equol 産生能の向上が報告されている難消化性糖質がある。難消化性糖質は

腸内環境を修飾し、腸内フローラの増殖を促進するプレバイオティクスであるが、そうした腸内細菌環境の変化が Equol 産生能の変化に繋がっていると考えられる。一方で、抗生物質では逆にイソフラボン代謝が障害され、Equol 産生能が減少することが推測される。

そこで本研究の実験 1 では、骨粗鬆症モデル動物のイソフラボン代謝に影響を与える抗生物質またはプレバイオティクス投与による Equol 及び *O*-DMA 産生量の変化と骨密度あるいは骨強度との関係を検討した。また、Equol には 2 種類の鏡像異性体の (S)(-) 体および (R)(+) 体が存在し、非産生者の Equol 摂取においては、より強い骨代謝調節作用を有する異性体を選択することが望ましい。既に、骨粗鬆症モデル動物により、これらの構造の違いによる骨量減少抑制効果は (S) 体で強く、また血中濃度も (S) 体の方が高くなることを見出しているが、何故、(S) 体で効果が強いのかに関する詳細なメカニズムについては不明である。そこで、実験 2、3 及び 4 では、*in vivo* 及び *in vitro* 試験にて両鏡像異性体の骨代謝改善効果の比較検討を行い、その作用メカニズムの解明を試みた。

実験 1: 抗生物質・プレバイオティクス投与によるイソフラボン代謝および骨代謝への影響

実験 1-1: Kanamycin 投与によるイソフラボン代謝・骨代謝への影響

体内におけるイソフラボン代謝は腸内環境により左右されることから、実験 1-1 では、Equol 産生を担う腸内環境を破壊する抗生物質の Kanamycin (KN) 投与試験を行った。8 週齢の ddY 雌マウスを用い、Sham (偽手術) 群、OVX (卵巣摘出骨粗鬆症モデル) 群、KN

* 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部 部長

群 (OVX+0.3% KN), Daidzein (Dz) 群 (OVX+0.1% Dz), Dz+KN 3.75 群 (OVX+0.1% Dz+0.0375% KN), Dz+KN 7.5 群 (OVX+0.1% Dz+0.075% KN), Dz+KN 30 群 (OVX+0.1% Dz+0.3% KN) の計 7 群に配し, 4 週間の飼育観察を行った。解剖後, 子宮, 大腿骨及び血液を採取し, 大腿骨の軟 X 線画像・骨密度 (BMD), 血中 Dz 及び代謝産物濃度を測定した。子宮重量は OVX により低下したが, KN または Dz 摂取による影響は認められなかった。Dz 摂取群において, 血中 Dz 濃度は KN 投与により変化しなかったが, Equol 及び O-DMA 濃度は低下し, Dz 摂取による骨量減少抑制効果は KN 投与で消失した。大腿骨の軟 X 線画像もその結果を反映していた。以上より, OVX マウスにおける Dz の骨量減少抑制効果は, KN 投与による腸内細菌環境の変化に伴う血中 Equol 濃度の低下により消失することが示され, Equol 産生量に依存しうる可能性が示唆された。

実験 1-2: セロオリゴ糖投与によるイソフラボン代謝・骨代謝への影響

実験 1-1 とは逆に, Equol 産生能向上に寄与する可能性のあるプレバイオティクスについて検討した。これまで, プレバイオティクスとして知られる幾つかの難消化性糖質投与による Equol 産生増加と骨量減少モデルの骨代謝改善効果について報告されてきたが, Daidzein のもう一つの代謝産物である O-DMA 動態についての知見はない。そこで実験 1-2 では, OVX マウスに, イソフラボン代謝研究では新規の難消化性糖類であるセロオリゴ糖 (COS) とイソフラボン配糖体 (ISO) を併用摂取させ, Equol・O-DMA 産生能および骨密度・骨強度に及ぼす影響を検討した。被験動物として 8 週齢の ddY 雌マウスを用い, Sham 群, OVX 群, ISO 群 (OVX+0.16%ISO 配糖体 (フジッコ(株) 社製), COS 群 (OVX+5%COS (日本製紙(株) 社製)), IC 群 (OVX+0.16%ISO 配糖体+5%COS) の計 5 群に分け, 6 週間の飼育観察を行った。解剖前 1 週間に渡り尿を回収し, 解剖後, 子宮を摘出し, 大腿骨・BMD 及び骨強度, 尿中 ISO および代謝産物濃度を測定した。ISO/COS 併用摂取により, Equol の尿中濃度は, ISO 群に対して IC 群で有意に高値を示した。逆に O-DMA の尿中濃度は ISO 群に対して IC 群で有意に低値を示し, Equol/O-DMA 比は ISO・COS 併用摂取により高値を示す結果となった。OVX により子宮重量は減少し, 大腿骨・BMD は減少または減少傾向を示した。COS の単独摂取群は, OVX 群に対して近位部と骨幹部 BMD で有意

に高値を示したが, ISO 単独もしくは併用の IC 群では大腿骨全体及び何れの部位でも有意に高値を示した。大腿骨・骨強度は, Sham 群に対して OVX 群で低下し, IC 群のみで有意にその低下が抑制された。以上より, COS は腸内フローラを修飾し, イソフラボン代謝を変化させることで, Equol/O-DMA 比を上昇させ, OVX 骨粗鬆症モデルマウスにおける骨強度低下抑制に寄与することが示された。

実験 2: 閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおける Equol 鏡像異性体の骨代謝調節作用の差異の解析

Equol には鏡像異性体の (S) 体と (R) 体が存在し, Equol 自体を摂取する場合, より効果的な方を選択し, 摂取する必要がある。そこで実験 2 では OVX マウスに Equol 鏡像異性体を投与し, 両鏡像異性体の骨代謝調節作用について比較検討を行った。

実験 2-1: 単一濃度による Equol 鏡像異性体の骨代謝への影響の解析

被験動物として 8 週齢の ddY 雌マウスを用い, Sham 群もしくは OVX 群に分け, さらに OVX マウスに Vehicle, Equol の (S) 体, (R) 体および racemi (R, S) 体を各 0.5mg/day 投与した計 4 群を配し, 4 週間の飼育観察を行った。Vehicle (DMSO+PEG) または各 Equol は浸透圧ポンプにて皮下投与した。解剖時に子宮, 大腿骨及び脛骨, 血液を採取し, 種々の測定に用いた。子宮重量は, Sham 群に対して OVX を施した全群で有意に低値を示した。また, OVX 群間に有意差はなく, 各 Equol 投与による子宮重量への影響はみられなかった。続いて大腿骨 BMD を測定したところ, (S) 体投与群のみで骨量減少抑制効果が確認された。加えて, 血中の両鏡像異性体濃度は racemi 体投与群で (R) 体よりも (S) 体で明らかに高値を示したことから, 加えて各鏡像異性体単独投与群では, 脛骨中でも (R) 体より (S) 体の方が高値であったことから, (S) 体の方が骨に到達する濃度が高く, OVX マウスでの骨量減少抑制は (S) 体の作用であることが推測された。大腿骨中の骨代謝関連遺伝子発現を real-time PCR にて解析したところ, 骨吸収を担う破骨細胞の分化関連遺伝子 (RANKL, NFATc1) の発現は, Sham 群に対し OVX 群で有意に上昇し, その OVX 群での上昇に対して (R) 体投与群で差を示さなかったが, (S) 体投与群では有意に低下した。他の骨吸収関連遺伝子である TRAP, CTSK に関しても同様の結果が示され, (S) 体投与により *in vivo* における破骨細胞分化が抑制されているこ

とが示唆された

さらに, Equol 鏡像異性体の効果の差異の詳細について検討すべく, 大腿骨を用い, DNA マイクロアレイ法による網羅的な遺伝子発現変動解析を行った。その結果, 階層的クラスター解析では, Sham, OVX, OVX + (S) 体, OVX + (R) 体の 4 群で異なるクラスターリングとなったが, クラスター間の距離については, OVX + (S) 体が Sham に近く, OVX + (R) 体が OVX に近くなる結果となった。また 1.3 倍以上発現変化があった遺伝子の中から, $p < 0.05$ で Sham 群に対して OVX 群で発現が上昇し, かつ OVX 群に対して S 体投与群で発現が低下した遺伝子を抽出したところ, 17 遺伝子が候補として挙げられた。遺伝子の機能別分類を行う Gene Ontology 解析の結果, 複数カテゴリにまたがるものを含めて, Biological Process (BP) に 8 遺伝子, Cellular Component (CC) に 13 遺伝子, Molecular Function (MF) に 9 遺伝子分類された。その中で骨代謝との関連が予想される遺伝子として, BP から *SCN2A1*, *FGFBP1* を, CC から *CAMK1G*, *CD2* を, MF から *SLC10A6*, *SLC16A12* を選び, real-time PCR 解析を行った。その結果, DNA マイクロアレイ解析の結果と同様の傾向が示された。このことから Equol 鏡像異性体である (S) 体と (R) 体とは遺伝子発現変動においても差が認められ, (S) 体の骨代謝調節作用が (R) 体よりも強いことが示唆された。

実験 2-2: 用量変化による Equol 鏡像異性体の骨代謝調節作用の解析

実験 2-1 より Equol 鏡像異性体の骨代謝に対する影響は異なることが明らかとなった。そこで次に, 各 Equol 鏡像異性体の投与量を変化させることによる骨代謝調節作用の差異について解析を行った。これまでの実験と同様に, 8 週齢 ddY 系雌マウスに Sham または OVX を施した。OVX を施したマウスは, OVX 単独群に加え (S) 体, (R) 体をそれぞれ 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/day 投与した 8 群に分け, 計 10 群で 4 週間の飼育観察を行い, 大腿骨 BMD, 子宮重量および血中サイロキシニン (T_4) 濃度を測定した。その結果, OVX 群に対して (S) 体, (R) 体投与群ともに濃度依存的な子宮重量の増加傾向を示したが, (S) 体投与では 0.5 mg/day 以上の投与群から有意に増加し, (R) 体投与群では 2 mg/day 投与群のみが有意に高値を示した。しかし, 最も高値を示した 2 mg/day の (S) 体投与群でも Sham 群に対して, 明らかに低値であった。また, イソフラボン高用量投与で変動するとの報告がある血中 T_4 濃度で

は, 全群間において差は認められなかった。加えて, 大腿骨 BMD は OVX 群に対して 0.5 mg/day 以上の (S) 体投与群で有意に高値を示し改善作用が認められたが, (R) 体投与群は濃度を変化させても改善作用を示さなかった。これらのことから, 子宮重量への影響も (S) 体の方が強いが, 用量を変化させても大腿骨の骨量減少抑制効果は (S) 体のみで示されることが明らかとなった。ただし, 用量によって濃度依存的な子宮重量の増加がみられたため, 子宮への影響を最小限に留め, 骨代謝を改善する投与量を考慮する必要がある。

以上の結果より, 骨代謝改善作用は, *in vivo* においては (S) 体の方が (R) 体よりも強くあらわれ, それは, (S) 体の生体内濃度が (R) 体よりも高いことに起因する可能性が示唆された。

実験 3: Equol 鏡像異性体の骨代謝調節メカニズムの解析

実験 1, 2 の *in vivo* 試験では, 生体内濃度の違いにより, (S) 体のより高い有効性が示唆されたが, 両鏡像異性体の骨代謝への直接的な影響を解明するため, マウス骨髄細胞および破骨細胞と骨芽細胞の各培養細胞株を用いた *in vitro* 試験にて比較検討を行った。

実験 3-1: マウス骨髄細胞 (BMC) における Equol 鏡像異性体の影響の解析

マウス大腿骨および脛骨から骨髄細胞 (BMC) を採取し, 活性型ビタミン D_3 で破骨細胞に分化誘導した。この分化誘導時に, 両鏡像異性体 Equol を各々 0.1, 1, 10 μ M の濃度で添加した。分化誘導 6 日後に酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色により破骨細胞数を測定し, 破骨細胞形成率を算出した。また, 破骨細胞分化関連遺伝子については real time-PCR 法にて解析した。その結果, 破骨細胞形成は (S) 体, (R) 体ともに 0.1 μ M から濃度依存的に低下した。破骨細胞分化関連遺伝子である *RANKL*, *c-Fos* の発現も破骨細胞形成抑制効果と同様に, (S) 体に比し (R) 体で両遺伝子の発現を有意に抑制したが, いずれの遺伝子発現抑制作用についても (R) 体が (S) 体に比し, より強い効果を示した。以上より, BMC を用いた Equol 鏡像異性体の破骨細胞分化抑制効果は, *in vivo* 試験とは逆に (R) 体で強くあらわれたことが明らかとなった。

実験 3-2: 破骨細胞様前駆細胞 (RAW264.7 細胞) における Equol 鏡像異性体の影響の解析

BMC を用いた培養は, 骨芽細胞と破骨細胞が共存す

る培養系となることから、破骨細胞単独での影響を解析するため、破骨前駆細胞様細胞株である RAW264.7 細胞を用いた Equol 鏡像異性体による分化抑制効果について比較検討した。RAW264.7 細胞に 100ng/ml RANKL による破骨細胞分化誘導と同時に、両異性体を 0.1, 1, 10 μ M の濃度でそれぞれ添加した。分化誘導 4 日後に TRAP 染色により破骨細胞数を測定した。その結果、(S) 体、(R) 体ともに破骨細胞分化を抑制したが、両異性体での破骨細胞分化抑制作用の差は認められなかった。このことから、Equol 鏡像異性体の破骨細胞分化抑制作用の差異は、破骨細胞における直接的な分化抑制に起因するものではない可能性が考えられた。

実験 3-3: 骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) における Equol 鏡像異性体の影響の解明

次に骨芽細胞単独での影響を解析するため、骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞を用いて、両異性体の破骨細胞分化に必須な RANKL 発現に対する影響を検討した。MC3T3-E1 細胞をコンフルエントまで培養後、アスコルビン酸、 β -グリセロリン酸、ハイドロコルチゾンによって骨芽細胞に分化誘導すると同時に、両異性体 Equol を各々 0.1, 1, 10 μ M の濃度で添加した。分化誘導 15 日後に、real-time PCR 法を用いて RANKL の発現について解析したところ、(S) 体よりも (R) 体でその遺伝子発現が強く抑制された。これらのことから、BMC を用いた実験 3-1 で観察された (R) 体の強い破骨細胞分化抑制作用は、骨芽細胞での RANKL 発現における抑制作用に起因することが示された。以上のことから、*in vitro* 試験では、同量暴露の条件下であれば (R) 体の方が強く RANKL 発現を抑制することで、予想に反し、(R) 体でより強い破骨細胞分化抑制作用を持つことが推測された。

実験 4: Equol 鏡像異性体の生体内利用率の差異の解明

in vivo では (S) 体の方で骨代謝改善作用が強く、*in vitro* では (R) 体の方で破骨細胞分化抑制作用が強いという矛盾を説明するため、実験 2-1 で観察された Equol 鏡像異性体の生体内濃度が異なる点に着目し、鏡像異性体間で生体内利用率に差異がある可能性を検討した。

実験 4-1: Caco-2 細胞における Equol 鏡像異性体抱合体の脱抱合による再吸収への影響

先ず Equol 鏡像異性体の生体内濃度が異なる点について、前述のマウスへの投与形態は、浸透圧ポンプを用

いた皮下投与であったことから、腸管における再吸収時の差異を推測した。イソフラボン類は吸収後、抱合化反応を受けて腸肝循環し、再吸収時には β -glucuronidase により脱抱合され、アグリコンとして再吸収されるため、この脱抱合酵素が、基質である (S) 体と (R) 体の構造の違いを認識し、(R) 体よりも (S) 体の脱抱合化反応を進める可能性を考えた。Equol 抱合体は、グルクロン酸 (GA) 抱合型が多くを占めており、ヒトとマウスでは両鏡像異性体共に 7 位抱合体 (S7G, R7G) が優位に産生されるため、Caco-2 細胞を用いて管腔側に S7G または R7G を β -glucuronidase と共に添加したところ、管腔側および基底膜側で、(R) 体に対して (S) 体の有意なアグリコン濃度上昇が確認され、管腔側の S7G 濃度は、R7G 濃度よりも有意に低下していた。

実験 4-2: Equol 鏡像異性体の胃内単回投与による血中経時変化 (ラット)

次に、雄性 Sprague-Dawley ラットの中心静脈にカテーテルを留置後、(S) 体、(R) 体 (50mg/kg 体重) をゾンデにより胃内単回投与した。0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 時間後に無麻酔、無拘束下で採血を行い、各採血ポイントの Equol 濃度を測定し、血中経時変化の曲線下面積 (AUC) を算出した。その結果、腸肝循環の始まる投与 2 時間以降から 24 時間まで、血中濃度は (R) 体に対して (S) 体で有意に高値を示し、AUC が示す吸収量の比較でも、(S) 体投与ラットの方が (R) 体と比較して明らかに高値を示した。以上より、*in vivo* 試験での Equol 鏡像異性体のマウスにおける骨代謝調節作用の差異は、両異性体の構造の違いによる腸肝循環時の再吸収の際の脱抱合と生体内利用率の差に起因する可能性が示唆された。

本研究では、大豆イソフラボン代謝産物の産生能は腸内環境に左右されるため、抗生物質投与では Equol 及び O-DMA 産生が低下し、骨代謝改善効果も消失する結果となり、プレバイオティクスのセロオリゴ糖によって Equol/O-DMA 比が上昇し、閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおける骨代謝を改善することが示された。さらに、これまで不明であった Equol 鏡像異性体の骨代謝調節作用における差異について、*in vitro* では (R) 体での作用が強いにも関わらず、(S) 体の腸肝循環と生体内利用率の高さにより *in vivo* では (S) 体の骨代謝改善作用が強くなるというメカニズムが明らかとなり、Equol の直接的な摂取に際しては、(S) 体の有効性が示唆された。

今後はヒトでの詳細な検討が必要であるが、以上の結果により、Equol 低・非産生者でも Equol の骨代謝改善効果を楽しむことが推察され、増え続ける骨粗鬆症予防や改善の一助となる可能性が示唆された。

【Abbreviations】

RANKL, receptor activator of nuclear factor κ -B ligand
TRAP, tartrate-resistant acid phosphatase
NFATc1, nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1

CTSK, cathepsin K

CAMK1G, calcium/calmodulin-dependent protein kinase I gamma

SCN2A1, sodium channel, voltage-gated, type II, alpha 1

FGFBP1, fibroblast growth factor binding protein 1

CD2, CD2 antigen

SLC10A6, solute carrier family 10 member 6

SLC16A12, solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 12

審査報告概要

本研究では、イソフラボン代謝産物 Equol および *O*-DMA の産生能・骨代謝改善効果について、骨粗鬆症モデルマウスへの抗生物質またはプレバイオティクス投与による影響を検討し、次いで Equol 鏡像異性体の骨代謝調節作用の差異とその作用メカニズムについて、骨粗鬆症モデルを用いた *in vivo* および骨髄・破骨・骨芽細胞を用いた *in vitro* 試験を行い比較したところ、抗生物質投与でイソフラボン代謝産物産生能と骨量減少抑制効果は阻害され、イソフラボン・プレバイオティクス併用

摂取による Equol/*O*-DMA 比の上昇に伴う骨強度低下抑制効果が示された。更に、Equol 鏡像異性体の効果の差異は、*in vivo* 試験では生体内利用率 (Equol 抱合体の脱抱合による再吸収) の違い ((*S*) 体 > (*R*) 体), *in vitro* 試験では骨芽細胞由来分子 (RANKL) の関与による骨吸収抑制能の違い ((*R*) 体 > (*S*) 体) に起因することを明らかにした。よって、審査員一同は、藤井駿吾氏に博士 (食品栄養学) の学位を授与する価値があると判断した。